

FLUSSRATEN, GESAMTEIWEISS, IGA UND
LYSOZYM-SEKRETIONSVERÄNDERUNGEN
UND DISKELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG
VON SEKRETEN MENSCHLICHER OHRSPEICHELDRÜSEN
MIT TUMOREN

Lothar Baur

1977

Gesamtherstellung

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik
der Universität München
Dir.: Prof. Dr. H. H. Naumann

FLUSSRATEN, GESAMTEIWEISS, IGA
UND LYSOZYM-SEKRETIONSVERÄNDERUNGEN
UND DISKELEKTROPHORETISCHE AUF-
TRENNUNG VON SEKRETEN MENSCHLICHER
ÖHRSPETCHELDRÜSEN MIT TUMOREN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät
der

Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Lothar Baur
aus

Bobingen
München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr.H.Eichner

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.H.Naumann

Dekan: Prof.Dr.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.1977



Für die Bereitstellung des Themas und die Ermöglichung der experimentellen Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr.H.H.Naumann herzlich danken. Herrn Privatdozent Dr.H.Eichner gilt mein besonderer Dank dafür, daß er mich unermüdlich und mit viel Geduld in die Wissenschaft einführte und mir jederzeit mit seinem Rat zur Seite stand.

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	5
1. Flußraten	5
2. Proteinuntersuchungen	6
3. Lysozym	9
4. Immunglobulin A	11
C. Methodischer Teil	14
1. Patientengut	14
2. Sekretabnahme	15
3. Gesamtproteinbestimmung	15
4. Diskelektrophorese	17
5. Lysozym	19
6. Immunglobulin A	20
D. Ergebnisse	24
1. An Normalpersonen	24
2. An Drüsen mit pleomorphen Adenomen	29
3. An Drüsen mit Cystadenolymphomen	43
4. An Drüsen mit Malignomen	53
5. Zusammenfassende Tabelle aller Sekretbefunde	61
E. Diskussion	62
Literaturverzeichnis	66

A. Einleitung:

Veränderungen in der Speichelzusammensetzung sollen teils als Ursache von speziellen Drüsenerkrankungen entstehen, teils als Folge von Allgemeinerkrankungen, wie Störungen des Drüsenstoffwechsels, der Gicht, des Diabetes und anderer hormoneller Störungen. Über derartige Speichelveränderungen wurde vereinzelt berichtet (BRANDS, MANDEL, SEIFERT, VOGT).

Ergebnisse über biochemische Veränderungen des Speichels bei verschiedenen Ohrspeicheldrüsenerkrankungen existieren bisher hauptsächlich über das Ausscheidungsverhalten der Elektrolyte, insbesondere bei Ohrspeicheldrüsenentzündungen. In einer Reihe von biochemischen und physiologischen Untersuchungen ist die Proteinzusammensetzung beschrieben (BHOOLA, BRANDTZAEG, FERGUSON, MAYO, WOTMAN). Diese Ergebnisse wurden allerdings in der Regel von Misch- oder Sammelspeichel gewonnen. Bei Parotistumoren sind bisher keine Untersuchungen über die Eiweißzusammensetzung, bzw. eine Veränderung einzelner Proteinkomponenten, wie Immunglobulin A oder Lysozym beschrieben.

Deshalb wurde versucht mit den sialochemischen Untersuchungen der Sekrete kranker Ohrspeicheldrüsen neben

Sialographie, Szintigraphie und histologischer Untersuchung einen weiteren Beitrag zur Diagnostik zu leisten.

Die individuelle Variationsbreite der Speichelzusammensetzung hängt im wesentlichen von zehn Faktoren ab. Diese im Folgenden beschriebenen Faktoren galt es bei allen Patienten möglichst gleich zu halten.

1. Flußrate: Ihr wurde dadurch Rechnung getragen, daß die Abnahme immer auf die gleiche, später im Einzelnen beschriebene Art erfolgte und daß bei der Betrachtung der einzelnen untersuchten Parameter nicht die Konzentrationen, sondern die Gesamtausscheidung pro Zeiteinheit und Drüse herangezogen wurden.
2. Reizart: Es wurde immer entweder mit Ascorbinsäure (Cebion-Lutschtabletten) gustatorisch, oder mit subcutaner Injektion von 0,07 mg Pilocarpin/kg Körpergewicht gereizt.
3. Reizdauer: Der gustatorische Reiz war immer gleich lang.
4. Hormonlage: Auf hormonelle Veränderungen im Gesamtkörper wurde insoweit geachtet, als Patienten mit Diabetes, anderen hormonellen Störungen oder Immundefekten von der Studie ausgeschlossen wurden.

- 5.Alter: Diese beiden Faktoren spielen, wie Ergebnisse an Normalpersonen zeigten, eine untergeordnete Rolle und wurden vernachlässigt.
- 6.Geschlecht:
- 7.Diät u. Essensge-
wohnheiten: Alle Patienten waren stationär aufgenommen und nahmen nur Krankenhauskost zu sich.
- 8.Plasmaspiegel der un-
tersuchten
Stoffe: Vor der Speichelabnahme wurden die Plasmaspiegel der zu untersuchenden Stoffe bestimmt.
- 9.Psychologische Fak-
toren: Ihnen wurde dadurch Rechnung getragen, daß bei allen Patienten die Sekretabnahme im selben Raum erfolgte und die Patienten vorher eingehend über Art und Zweck der Untersuchung unterrichtet wurden.
- 10.Zirkadian-
schwankungen: Nach ausführlichen Untersuchungen von FERGUSON, DOWES und ALBEGGER unterliegen die einzelnen ausgeschiedenen Stoffe menschlicher Ohrspeicheldrüsen Zirkadian-schwankungen. FERGUSON bestimmte die Tagesschwankungen von Flußraten, Elektrolyten und Gesamteiweiß. Er fand einen

biphasischem Zyklus der Flußraten mit einer Sekretionsspitze am Morgen um 7 Uhr, einer kleineren Spitze gegen 19 Uhr. und einem Sekretionstief um 13 Uhr. Gleichsinnig verhalten sich Natrium und Chloridausscheidung, gegensätzlich die Kaliumausscheidung. Nur ein einziges Sekretionsmaximum zeigen die Calcium- und Phosphatausscheidung mit einer Spitze um 14 Uhr und einem Tief um 13 Uhr.

Erhebliche, aber uneinheitliche Zirkadian-schwankungen, mit Unterschieden bis zu 300 %, zeigt auch die Proteinausscheidung, mit einem Minimum um 6 Uhr und einem Maximum um 20 Uhr.

Aus diesen Gründen wurde die Sekretabnahme in eine Phase mit Normalsekretion, in die Zeit von 9 bis 11 Uhr, verlegt.

B. Theoretischer Teil:

1. Flußraten:

Die wenigsten Untersuchungen des Parotisspeichels beruhen auf der hier verwendeten Methode der Kanülierung des ductus Stenoni. Meist wurde der Speichel mit Hilfe einer der vielen Variationen der sog. "LESHLEY-CUP" gewonnen. Dieses Gerät besteht aus zwei getrennten Kammern: einer äußeren, verbunden mit einer Vakuumvorrichtung zum Befestigen der Kapsel an der Mundschleimhaut und einer inneren Kammer, die das aus dem Drüsenausführungsgang abtropfende Sekret sammelt und über einen Schlauch nach außen abgibt.

Zum Haften der Kapsel ist ein Unterdruck von 200 bis 250 mm Hg erforderlich.

Mit dieser Vorrichtung ist es kaum möglich zwischen Reiz und Ruhesekret zu unterscheiden, da das Ansaugen einen mechanischen Reiz darstellt. Dieser Reiz ist nicht zu quantifizieren. Außerdem stellt diese Abnahmeart eine nicht unerhebliche Belastung für den Patienten dar.

2. Proteinuntersuchungen:

Einleitung:

Untersuchungen, die sich mit der Klärung der Gesamtproteinausscheidung der Ohrspeicheldrüsen befaßten, zeigten, daß die Proteinkonzentrationen wesentlich von der angewandten Bestimmungsmethode abhängig sind.

Je nach Methode der Eiweißbestimmung können die Ergebnisse bei gleichen Sekreten bis um den vierfachen Wert schwanken (SKUPK, WOLF).

Rauchfand nach Stimulation von Speicheldrüsen mit steigender Flußrate teils starken Anstiege, teils starken Abfall der Proteinkonzentration. Er konnte keine Relation zum Sekretionsminutenvolumen herstellen. Untersuchungen über die einzelnen Proteinfractionen gesunden, menschlichen Parotissekretes wurden von einer Reihe von Autoren vorgenommen (CHAUNCEY, TOMASI, WOLF, MASON, MANDEL, KAUFMANN, AMSTRONG, BRANDTZAEG). Nichts ist bisher über Veränderungen der Eiweißzusammensetzung des Sekretes bei Speicheldrüsentumoren bekannt.

Theorie der Gesamteinbestimmung:

Die Gesamtproteinbestimmung wurde nach einer von MAURER angegebenen Schnellbestimmung von Gesamt-

protein im Liquor cerebrospinalis ohne Fällung mit einer modifizierten Biuretmethode vorgenommen.

Die Eiweißkonzentrationen des menschlichen Speichels liegen, wie die des Liquors, unterhalb der Nachweisgrenze der Standard-Biuretmethode.

Deshalb wurde von Maurer die Empfindlichkeit dieser Nachweisreaktion, ohne zusätzlichen zeitlichen und apparativen Aufwand, durch die Verwendung einer stark alkalischen Lösung von Kupfer(II)sulfat in 40 % iger Äthylenglykollösung erhöht.

Theorie der Diskelektrophorese:

Die Diskelektrophorese beruht auf dem Prinzip, mit Hilfe eines diskontinuierlichen Trennsystems, hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße, ein Proteingemisch zu trennen.

Dadurch wird, gerade bei niedrigen Eiweißkonzentrationen der aufgetragenen Substanzen, eine scharfe Trennung erreicht. Für dieses wesentlich schärfere Auflösungsvermögen der Diskelektrophorese im Vergleich zur Papier- und Zelluloseacetat-Elektrophorese sind somit zwei physikalische Effekte verantwortlich.

Einmal ein Konzentrierungseffekt: danach werden durch die pH-Unterschiede zwischen Sammel- und Trenn-Gel die Substanzen vor ihrer Trennung zu einer scharf begrenzten Zone konzentriert. Zum anderen ein Molekularsiebeffekt: hierfür sind die erhöhte Viskosität des Gels

und die dadurch verursachten höheren Reibungswiderstände verantwortlich.

Die einzelnen Proteinfraktionen werden somit neben ihrer elektrischen Ladung auch hinsichtlich ihrer Größe und Gestalt, d.h. Molekulargewicht und Tertiärstruktur, aufgetrennt. Dieser Molekularsiebeffekt kommt besonders bei Proteinen zum Tragen, die gleiche Ladung, aber unterschiedliche Größe haben. Derartige Proteine können mit trägerfreien Elektrophoresen nicht getrennt werden.

Zur Auftrennung wurde ein 7,5 % iges Acrylamid-Mittelporgel, pH 8,8 verwandt. Nach Voruntersuchungen mit verschiedenen anderen Acrylamidgel-Zusammensetzungen, wie sie von MAURER angegeben wurden, stellte sich das 7,5 % ige Mittelporgel, mit einer Porenweite von $50 \text{ \AA}$, als optimal für die Speichelproteintrennung heraus.

Dieses Gel trennt Proteingemische mit einem Molekulargewicht von 10^4 bis 10^6 auf und hat einen optimalen Trennbereich bei $3 \text{ mal } 10^4 - 10^5$.

Das Polyacrylamidgel entsteht als Polymerisationsprodukt von Acrylsäureamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und einem Vernetzer, N,N'-Methylbisacrylsäureamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels hängen teils vom Polymerisationsgrad (Kettenlänge) des Polyacrylamids, teils vom Vernetzungsgrad ab.

3. Lysozym:

Einleitung:

1922 fanden FLEMING und ALLISON im Speichel, Tränen- und Nasensekret und im Serum eine Substanz, die die Fähigkeit besitzt, bestimmte Bakterien aufzulösen. Diese Substanz hatte enzymatische Eigenschaften und wurde von ihnen Lysozym genannt.

Das Lysozym richtet sich vor allem gegen grampositive Keime, im besonderen gegen *Micrococcus lysodeicticus*.

Lysozym findet man in vielen menschlichen, tierischen und pflanzlichen Zellen und Sekreten. Eine besonders hohe Konzentration an Lysozym enthält das Hühnereiweiß. Aus ihm wurde Lysozym zum ersten mal in kristalliner Form isoliert (ALDERTON, JOLLES). Von den Leukozyten enthalten die Zellen der granulozytären Reihe, sowie die Monozyten das Enzym.

Theorie:

Lysozym ist ein basisches Polypeptid mit einem isoelektrischen Punkt um 11,0 und einem Molekulargewicht von 14000 bis 15000.

Die Bakteriolyse beruht auf der Hydrolyse eines Bestandteiles der Bakterienzellwand, wahrscheinlich eines Mucoproteins (BURGEN 1961). Pneumokokken, Koli-

bakterien und Diphteriebazillen sind in vitro resistent. Antikörper, Komplement, Lipasen und Proteasen können durch Freisetzung des Substrates synergistisch mit Lysozym eine Bakteriolyse bewirken, obwohl diese Bakterien bei In-vitro-Versuchen resistent gegen Lysozym sind, da durch sie das Substrat für Lysozym angreifbar wird (FLEMING, MEYER, JOLLES, SALTON).

In vielen externen Sekreten kommt Lysozym und Immunglobulin A gemeinsam vor. Außerdem soll Lysozym als "Aktivator" des IgA zur antibakteriellen Aktivität dienen.

Diese beiden letztgenannten Gründe gaben die Veranlassung, neben dem Immunglobulin A auch das Lysozym im menschen Parotissekret zu bestimmen.

4. Immunglobulin A:

Einleitung:

Die mucösen Membranen unterscheiden sich vom Immunsystem des Serums wesentlich in der Immunglobulin-zusammensetzung.

	IaG	IaA	IaM	IaD	IaE	
Serum	1300	210	130	20	0,03	mg%
Speichel	(10)	20	?	?	?	mg%

Dabei stellt das Immunglobulin A, welches im Serum nur einen Bruchteil, nämlich ein Sechstel aller Immunglobuline ausmacht, im Speichel den Hauptanteil dar. Die bisher von PIERCE, TOMASI, CHODIRKER, ADINOLFI, GABL, SOUTH, BRANDTZAEG und MASON angegebenen Werte für den Immunglobulingehalt des Parotissekretes variieren stark. Die Immunglobulin A-Konzentrationen schwanken zwischen 0,6 und 49,2 mg %. Von verschiedenen Autoren wurde in den letzten Jahren gezeigt, daß das Speichel-IgA zwar mit dem Serum-IgA kreuzreagiert, sich aber vom Serum - IgA durch eine Reihe serologischer, physikalischer und struktureller Eigenschaften unterscheidet. Die derzeitigen Anschauungen werden im Folgenden beschrieben.

Theorie:

Serum IgA bindet kein Komplement. Aus diesem Grund wurde kein direkter bakteriolytischer Effekt gefunden. In Verbindung mit Komplement und Lysozym jedoch ist das Immunglobulin A nach MASON im Stande auch *Escherichia Coli* zu lysieren.

Zwei monomere IgA-Moleküle, bestehend aus je zwei H- und L-Ketten formen unter Ausbildung von kovalenten Bindungen untereinander und mit Glykoproteinen, dem sog. "sekretorischen Stück", sowie der I-Kette, Molekulargewicht 23000, eine komplexe Verbindung, die man vereinfacht als dimeres IgA bezeichnen kann. Das I-Stück wird in den Epithelzellen der Schleimhäute synthetisiert, während die IgA-Anteile des Moleküls in Plasmazellen synthetisiert werden. Sekretorisches IgA besitzt Antikörperaktivitäten, einschließlich antibakterieller und virusneutralisierender Wirkung. Die Bildung von sekretorischem IgA scheint durch Infektion oder Antigenkontakt der Schleimhäute ausgelöst zu werden, und zwar dort, wo der Kontakt erfolgt, jedoch nicht durch parenterale Antigenapplikation.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Synthese und Funktion des Speichelimmunglobulin A sind widersprüchlich. Alle bisherigen Untersuchungen

zeigten, daß die Abwesenheit von Serum-IgA auch eine Abwesenheit von Speichel-IgA zur Folge hat. Untersuchungen mit injiziertem, radioaktiv markiertem IgA ergaben ebenfalls widersprüchliche Aussagen über den Nachweis des so kenntlich gemachten Immunglobulin A im Drüsensekret (TOMASI, SELNER, STIEM, HAWORTH). Untersuchungen von LEHNER, CARDWELL, CLARPY und Zengo zeigten erhöhte IgA-Spiegel bei Patienten mit erhöhtem Widerstand gegen Karies. Von LEHNER wurden erhöhte Immunglobulinwerte bei Candidiasis des Mundes gefunden.

Daß die Synthese des sekretorischen IgA vor allem im rauen plasmatischen Reticulum in den Sekretgranula und im Golgi-Apparat erfolgt, zeigten elektronenmikroskopische Ergebnisse (KRAYENBÜHL, HURLIMANN).

Speichel-IgA wird durch Proteasenkonzentrationen die Serum-IgA bereits hydrolysieren, nicht angegriffen. Diese Resistenz beruht offenbar auf dem höheren Molekulargewicht (TOMASI).

C. Methodischer Teil:

1. Patientengut:

Insgesamt wurden 61 Patienten mit Ohrspeicheldrüsentumoren untersucht.

Das Patientenkollektiv setzte sich folgendermaßen zusammen:

28 Pleomorphe Adenome

10 wurden mit Ascorbinsäure gereizt,

18 mit Pilocarpin

11 Cystadenolymphome

5 wurden mit Ascorbinsäure gereizt,

6 mit Pilocarpin

12 Malignome

4 wurden mit Ascorbinsäure gereizt,

8 mit Pilocarpin

10 Normalprobanden als Kontrollgruppe

Die Patienten wurden nach postoperativer, histologischer Diagnosesicherung in die entsprechende Gruppe aufgenommen.

2. Methodik der Sekretabnahme (Flußraten):

Nach Aufsuchen des Ductus parotideus wird in diesen ein flexibler Polvvinylkatheter eingeführt, mit einem Gesamtdurchmesser von 1 mm und einem inneren Durchmesser von 0,5 mm und ca. 20 mm intraductal fixiert. Das abtropfende Sekret wurde in einem Fraktionsteiler in graduier-ten Zentrifugengläsern gesammelt. Es wurden 10-Minuten-Frak-tionen gewonnen, die erste Fraktion verworfen. Während der gesamten Abnahme wurde der Speichel in Eiswasser gekühlt. Die Menge des Sekretes wurde nach Abschluß der Untersuchung an den Zentrifugengläsern abgelesen und in das Protokoll eingetragen.

3. Methodik der Gesamtproteinbestimmung:

1,5 g Kupfersulfat werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Auflösung werden 40 ml Äthylenglykoll zugegeben und durchmischt. Unter ständigem Schütteln wird dann mit 2n Natronlauge auf 100 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten kann im Eppendorf-Photometer mit einem Filter von 546 nm der Leerwert bestimmt werden (2 ml Wasser und 0,4 ml des zusammengestellten Reagenz).

Der Bezugsstandard und die Eichkurve wurden nicht mit Hilfe einer standardisierten Rinderalbuminlösung erstellt, sondern, um einen möglichst entsprechenden Vergleichsstandard zu erhalten, mit definierten Mengen von lyophilisiertem und dialysiertem Parotisreizsekret. Von dieser gewonnenen Trockensubstanz wurde eine Eichlösung 20 mg/ml hergestellt und so, durch Einsetzen verschiedener Konzentrationen von 0,5 bis 20 mg, der hergestellten Eichlösung eine Eichkurve gewonnen. Mit dieser war es möglich durch entsprechenden Extinktionsvergleich der Speichelproben die Gesamtkonzentration zu bestimmen.

4. Methode der Diskelektrophorese:

Zum Gießen der Gele wurden Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 0,8 cm und einer Länge von 12 cm verwendet. Die Röhrchen wurden unten und oben abgeschliffen, um ein möglichst gleichmäßiges Fließen des angelegten Stromes zu gewährleisten.

Für das Gießen der Gele wurden drei Lösungen benötigt: Lösung I besteht pro 100 ml aus 48 ml 1n HCl, 36,6 g Trishydroxymethylammoniummethan und 0,8g N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin.

Der Katalysator ist ein Redox-System, das freie Radikale liefert und die Vorteile hat, bei 0 Grad relativ stabil zu sein, wenig molekularen Sauerstoff zu entwickeln und weder die Pufferbedingungen, noch die elektrische Leitfähigkeit und die Viskosität zu stören.

Lösung II besteht pro 100 ml aus 30 g Acrylamid und 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid, dem Vernetzer.

Lösung III schließlich enthält 60 mg Ammoniumperoxydisulfat in 100 ml Wasser.

Lösung I und II konnten vorrätig zubereitet werden, Lösung III mußte immer frisch angesetzt werden. Für die 16 Gele eines elektrophoretischen Laufes wurden 8 ml von Lösung I, 16 ml von Lösung II, 32 ml von Lösung III und 8 ml Wasser zusammenpipettiert.

Anschließend wurden die Glasröhrchen nach Abdichtung mit einer Plastikfolie bis zu einer eingezeichneten Marke mit der bereiteten Lösung gefüllt. Dann ließ man dieses Sol zunächst, unter Luftabschluß durch Übersichten mit Wasser, polymerisieren. Nach etwa einer Stunde ist der Polymerisationsvorgang beendet und es konnte nach Absaugen des Wassers der Elektrodenpuffer (Trisglycinpuffer pH 8,4) aufgetragen werden. Danach wurde vorsichtig mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze der Nativspeichel (0,1 ml pro Gel) unterschichtet, genau an der Puffer-Gel-Trennschicht. Die Auftrennung erfolgte in einem Vorlauf zur Zonenschärfung über 10 Minuten und einem Hauptlauf über 60 Minuten. Während des Einwanderns der Proteine in das Trenngel wurde die niedrigere Stromstärke von 2 mA pro Gel gewählt, um wegen des relativ hohen elektrischen Widerstandes, die Gefahr der thermischen Zerstörung der Proteine zu verringern. Im Hauptlauf mit 5 mA pro Gel.

Nach Abschluß der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt und der Coomassie-Brillantblue-Färbung unterzogen. (Coomassie-Brillantblue gilt als Standard-Färbelösung für alle Proteine) : Nach Denaturierung mit Trichlor-essigsäure werden die Gele in einer 1 %-igen Coomas-

sie-Brillantblue-Lösung über 24 Stunden angefärbt und anschließend mit 7,5 %-iger Essigsäure über 24 bis 36 Stunden entfärbt. Durch diese Färbung wurden sämtliche Proteinfractionen dargestellt.

Zur quantitativen Auswertung der einzelnen Fraktionen wurden die Gele densitometriert.

5. Methode der Lysozymbestimmung:

Das Prinzip beruht auf der bakteriolytischen Wirkung des Enzyms gegenüber hitzeabgetöteten *Micrococcus lysodeicticus*-Keimen. Die bakteriolytische Wirkung ist an der Klärung der bakteriellen Trübung im folgenden beschriebenen Plattentest im Agarosegel sichtbar. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 5 g Agarose (Behringwerke-Marburg) bei Raumtemperatur in 50 ml Natrium-Kalium-Phosphatpuffer suspendiert. Dieser SÖRENSEN-Na-K-Phosphatpuffer setzt sich aus 81,5 ml einer Lösung von 9,08 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1000 ml Wasser und 18,5 ml einer Lösung von 11,88 g Dinatriumhydrogenphosphat in 100 ml Wasser zusammen. Dann wird die suspendierte Agarose mit 450 ml des beschriebenen Puffers unter kräftigem Rühren bis zur Klärung der Suspension gekocht. Dann werden 50 mg Äthylenmercurithiosalicylsäure-Natriumsalz (Merthi-

olat) darin gelöst. Dieses Agarosegel kann nun luftdicht verschlossen in 100 ml-Portionen aufbewahrt werden. Vor Gebrauch werden in je 100 ml aufgekochtes und auf 63 Grad abgekühltes Agarosegel 100 mg lyophilisierte *Micrococcus-lysodeicticus*-Zellen (Serva-Heidelberg) gleichmäßig suspendiert. Diese Gelsuspension wird anschließend jeweils in 25 ml Portionen in die waagrechten Lysoplatten (s. Foto) pipettiert. Nach dem Erkalten werden mit einer Saugstanze 16 gleich große Löcher in das Gel gestanzt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde zwei mal umkristallisiertes, salzfreies, lyophilisiertes, reinstes Lysozym (Hühnereiweiß-Lysozym LYSF der Fa. Worthington Biochem. Corp. New Jersey) verwendet. Es wurden mit NaCl-Lösung verdünnte Standard-Lösungen aufgetragen, die je 100, 50, 10 und 5 μ g Lysozym pro ml enthielten. Nach genau 16 Stunden wurden die Durchmesser der Klärungszonen der Standard-Lösungen gemessen und auf semilogarithmischem Papier Durchmesser gegen die Lysozymkonzentrationen in μ g/ml aufgetragen. (Abb. 1)

Methode der Immunglobulin A-Bestimmung:

Die quantitative Bestimmung des Speichel-IgA wurde mit LC-Partigen Immundiffusionsplatten der Behring-

Werke Marburg, vorgenommen (LC = Low concentration). Die Platten enthalten eine gebrauchsfertige Agargelschicht mit spezifischem IgA-Antiserum und Natriumacid als Konservierungsmittel. Aus dem Gel sind ringförmig zwölf Löcher für die zu untersuchenden Proben gestanzt.

Je 0,02 ml der vorgesehenen Protein-Antigen-Lösung (Speichel oder Standard-Serum) wurden mit einer Hamilton-Mikroliterspritze in die Auftragstellen eingefüllt. Dann wurden die Platten verschlossen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer Diffusionszeit von 48 Stunden wurden die Präcipitationsdurchmesser bestimmt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde Standard-IgA-Serum der Behring-Werke verwendet. Es wurden Proben von 1 bis $10^{-8}/20$ l aufgetragen und die ermittelten Durchmesser quadriert gegen die Konzentration aufgetragen. (s. Abb. 2)



Abb.1 Agarosegel-Platte mit suspendierten
Micrococcus-lysodeicticus-Keimen zur Lyso-
zymbestimmung.

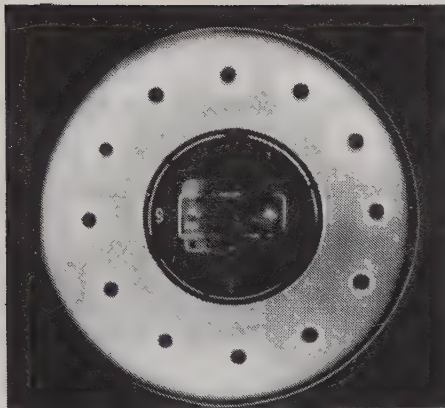


Abb.2 LC-Partigen-Immundiffusionsplatten der Behring-Werke zur Bestimmung der IgA-Konzentration.

D. Ergebnisse:

1. Ergebnisse an Normalpersonen:

Dieser Arbeit liegen die Ergebnisse von Untersuchungen an einem Normalkollektiv durch EHRICH und SCHIMMEL zu Grunde. An 10 Kontrollpersonen wurden folgende damitübereinstimmende Befunde erhoben.

Flußraten:

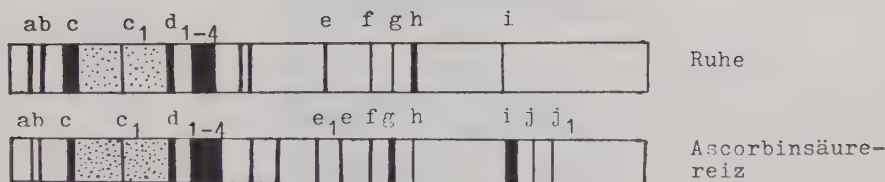
Bei den untersuchten Personen zeigte sich eine Ruhesekretion von 0,04 bis 0,10 ml/min/Drüse. Die Sekretion wuchs unter Ascorbinsäurereiz auf 0,2 bis 0,5 ml/min/Drüse. Nach Absetzen des Ascorbinsäurereizes kehrte die Sekretion rasch wieder auf Ruhesekretionswerte zurück. Bei erneutem Reiz durch subcutane Applikation von 0,07 mg Pilocarpin pro kg Körpergewicht zeigte sich eine 20 minütige Steigerung der Sekretion, die ein um 30 % höheres Maximum als nach Ascorbinsäure aufwies. Bei getrennter Sekretionsstimulierung mit ausschließlich Ascorbinsäure oder Pilocarpin fanden sich keine wesentlichen Unterschiede in den Flußratenmaxima.

Gesamtproteinausscheidung:

Die Gesamtproteinausscheidung liegt bei allen Drüsen in einem Bereich um 0,25 mg/min/Drüse. Altersunterschiede sind vernachlässigbar gering. Nach Ascorbinsäurereiz steigt die Proteinkonzentration, wie nach Pilocarpin-

reiz stark an. Bei Pilocarpinreiz ist die maximale Proteinausscheidung vergleichsweise höher.

Diskelektrophorese:



Die Banden werden dabei vom Auftragungspunkt her mit a bis j bezeichnet. Bei Ruhe und Reiz finden sich folgende charakteristischen Veränderungen.

Die Banden a, b, c werden bei Reiz schwächer. Die sich schwach anfärbende Zwischenzone zwischen c und d tritt deutlicher hervor. Die Bandengruppe d₁ bis d₄ wird bei Reiz etwas breiter und farbintensiver. Die folgende e-Bande wird bei Reiz mehr zu einer e-Zone. Die signifikantesten Bandenveränderungen zeigen sich im Bereich der Bandengruppe f, g, h, i und j. Während im Ruhesekret die h-Bande die stärkste ist, wird sie bei Reiz zunehmend kleiner und verschwindet fast ganz. Die Banden f und g werden etwas größer. Die stärkste Bande wird i. Zusätzlich entsteht bei Reiz noch die Doppelbande j und j₁. Bei Ruhe stellt sich nach einer Fraktion das alte Bandenmuster wieder ein. Die Banden a, b und c

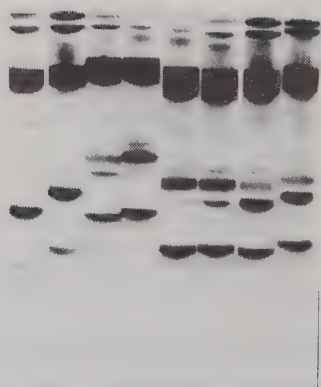


Abb.3 Diskelktrophoretische Auftrennung eines normalen Parotissekretes in Ruhe und Reiz.

und die Zwischenzone zwischen c und d sind Glycoproteine. Die Bande d besteht aus 4 eng aneinanderliegenden Untergruppen. Es handelt sich hierbei um die Isoamylasen. Die mit h bezeichnete Bande ist Albumin.
(Abb. 3)

Lysozym:

Die Konzentration in den Ruhesekreten variiert ebenso, wie die Immunglobulin A-Konzentration stark. Es werden Werte von 16 bis 520 $\mu\text{g/ml}$ Sekret gefunden. Unter Berücksichtigung der Flußraten, also in der Gesamtysozymausscheidung, wurde die Streubreite wesentlich geringer. Im Ruhesekret lag sie zwischen 8 und 16 $\mu\text{g/min/Drüse}$. Bei Ascorbinsäurereiz kommt es zu einem deutlichen kurzen Anstieg der ausgeschiedenen Lysozymmenge um ein mehrfaches der sezernierten Ruhemenge. Nach 20 Minuten wird die Ruhesekretionsausscheidungsrate wieder erreicht. Noch höhere Ausscheidungsmaxima als nach Ascorbinsäurereiz zeigen alle Drüsen nach Pilocarpinreiz.

Stellt man eine Beziehung zwischen IgA-Gesamtausscheidung und Lysozymgesamtausscheidung auf, so läßt sich feststellen, daß sich beide etwa reziprok verhalten. Das bedeutet, bei hoher IgA-Produktion herrscht eine niedrige Lysozymproduktion vor und umgekehrt.

Immunglobulin A:

Die IgA-Konzentrationen zeigten eine im Ruhesekret weite Streubreite mit Werten von 3 bis 30 mg %, ohne deutlichen Altersunterschied. Unter Ascorbinsäurereiz fällt die Konzentration nach 20 Minuten auf 15 % der ursprünglichen Konzentration. Danach bleibt sie über längere Zeit konstant. Bei Pilocarpinreiz steigt sie entsprechend der Flußratenveränderung langsam an. Nach Umrechnung der Konzentration auf die Gesamtausscheidung an IgA ist die Streubreite wesentlich geringer. Die sezernierte IgA-Menge steigt unter Reiz von ungefähr 10% auf 40%, um nach 20 Minuten wieder annähernd den Ausgangswert zu erreichen. Wegen der eindeutigeren Aussage der Gesamtausscheidung wurde dieser Parameter den folgenden Untersuchungen zu Grunde gelegt.

2. Pleomorphe Adenome:

Diese Tumorart, auch als Misch tumor bezeichnet, ist der häufigste Speicheldrüsentumor. Misch tumoren kommen hauptsächlich in der Ohrspeicheldrüse vor (FOOTE, ENEROTH, KLEINSASSER, RAUCH, UNGERECHT).

Die Misch tumoren sind eindeutig zu den gutartigen Tumoren zu zählen.

Pleomorphe Adenome stellen sich als langsam wachsende schmerzlose Knötchen dar. Sie sind in der Regel nicht mit dem umgebenden Gewebe verbacken.

Flußraten:

Die Ruhesekretion bei pleomorphen Adenomen liegt zwischen 0,02 und 0,2 ml/min/Drüse, also im Bereich der Ruhesekretion gesunder Drüsen.

Erst beim Anstieg zum Flußratenmaximum zeigt sich ein Unterschied zum Normalkollektiv. Der Anstieg ist langsamer, d.h. die Flußratenmaxima zeigen bei den durch Pilocarpin stimulierten Drüsen eine deutliche Verschiebung nach rechts. Die Spitzenflußraten sind annähernd gleich hoch. Bei einem Großteil der untersuchten Drüsen wird innerhalb des Untersuchungszeitraumes der Basissekretionswert nicht mehr erreicht. Daraus geht hervor, daß Drüsen mit pleomorphen Adenomen empfindlicher und anhaltender auf Reiz reagieren. (Abb. 4.)

Protein:

Gesamtproteinausscheidung:

Die sezernierte Gesamtproteinmenge im Ruhesekret zeigt verringerte Werte im Vergleich zum Normalkollektiv. Unter Reizbedingungen wird die verminderte Gesamtproteinausscheidung der Drüsen mit pleomorphen Adenomen signifikant, sowohl nach Pilocarpinreiz, als auch nach gustatorischer Reizung mit Ascorbinsäure. Dabei ist zu bemerken, daß nach Pilocarpinreiz bei normalen Drüsensekreten die Konzentration an Protein ansteigt, nach Ascorbinsäure jedoch in der Regel abfällt. Bei den Pleomorphen Adenomen hingegen findet man sowohl nach Pilocarpinreiz, als auch nach Ascorbinsäu-

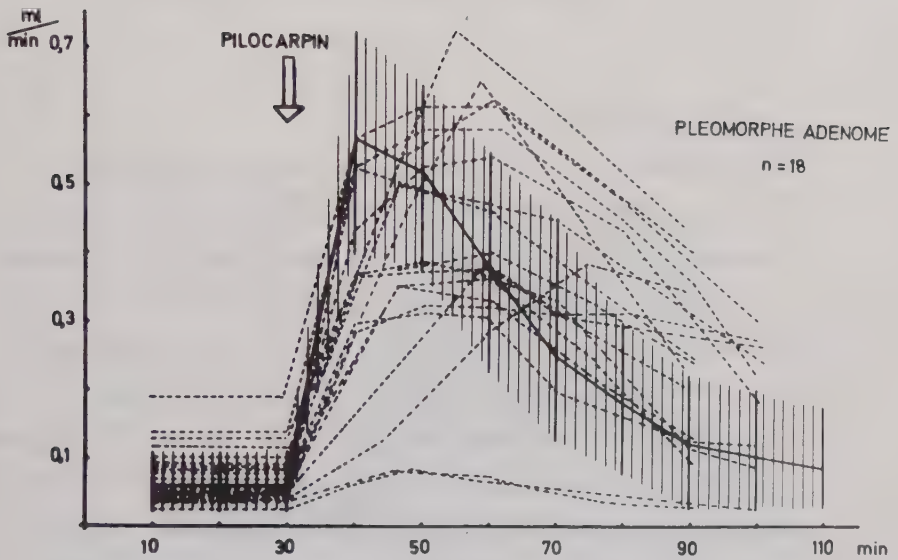


Abb.4.Flußratenkurve der Pleomorphen Adenome.(gepunktet)
Bei etwa gleich hohen Spitzenflußraten werden die Maxima
wesentlich später erreicht.(Normbereich schraffiert)

re eine fallende Proteinkonzentration im Sekret.

(Abb.5)

Diskelektrophorese:

Die Pleomorphen Adenome haben in der Regel infolge der geringeren Eiweißkonzentration im Sekret eine blässere Zeichnung der Bandenstrukturen. Neben einer Abschwächung der Zwischenzone c1, die den Hauptanteil der Glycoproteinfraktion darstellt findet sich eine Verschmälerung der d1 bis 4-Bandengruppe, die den Isoamylasen entspricht. Die anodennahe Bandengruppe f, g, h und i wird im Vergleich zu den Normalelektrophoresen markanter, da sie unverändert wie bei den Normalelektrophoresen dargestellt wird. Unter Reiz nehmen die Banden a, b, c stark an Farbintensität ab, ebenso wie die d1 bis 4-Bandengruppe. Im Gegensatz zu den normalen Drüsen nehmen in der Regel die Amylasekonzentrationen im Reizsekret ab, unabhängig von der Stimulationsart. Die Bandengruppe f bis j verhält sich unter Reiz wie die normaler Drüsen. Die h-Bande verschwindet fast ganz und tritt nach Absetzen des Reizes wieder deutlich hervor. (Abb.6)

Lysozym:

Im Gesamtsekretionsverhalten zeigt die Lysozymaus-

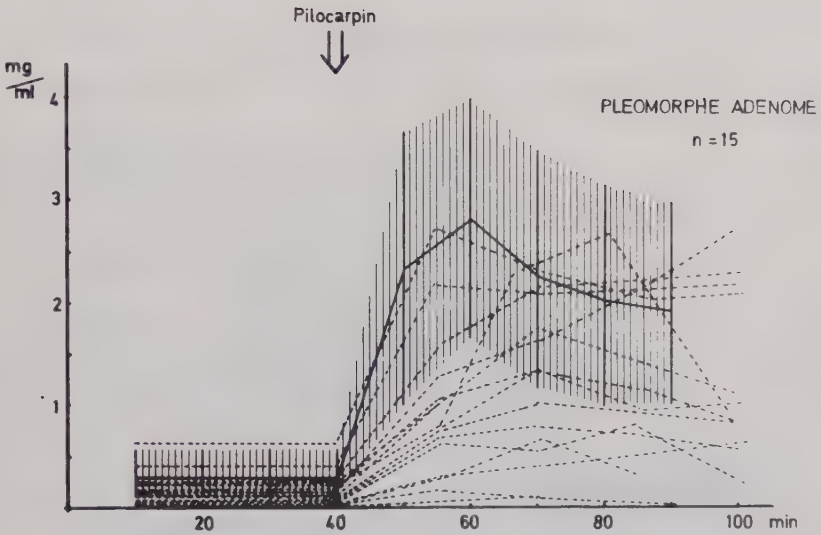


Abb.5. Gesamtproteinausscheidung der pleomorphen Adenome. In Ruhe und nach Pilocarpinreiz ist die Sekretion signifikant erniedrigt.

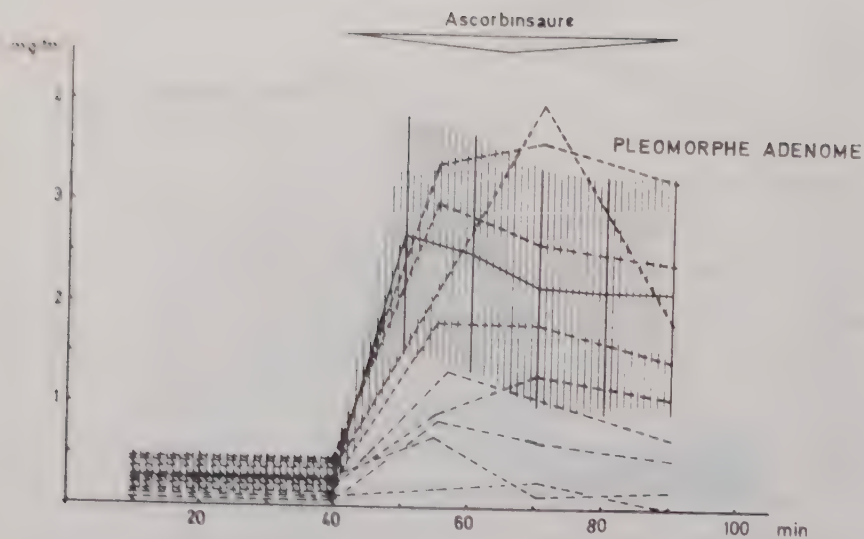


Abb. 5a. Gesamtproteinausscheidung der pleomorphen Adenome in Ruhe und nach Ascorbinsäurereiz. Die Ruhe und Reizsekretion liegt im unteren Normbereich, bzw. unter der Norm.

scheidung stärkere Schwankungen. Es kann kein reizabhängiges unterschiedliches Verhalten festgestellt werden.

Zum größeren Teil lag bereits die Ruhesekretion an Lysozym unterhalb der des Normalkollektivs. Nach Ascorbinsäurereiz, wie nach Pilocarpininjektion zeigte die Mehrzahl der an pleomorphen Adenomen erkrankten Drüsen ein geringeres Ausscheidungsmaximum. Die Werte der Ruhesekretion, bzw. Werte darunter wurden wesentlich schneller erreicht.

Hinsichtlich der Lysozymausscheidung wurden die Drüsen also schneller erschöpft. (Abb. 7)

Immunglobulin A:

Die Ruhesekretion zeigt eine größere Streubreite als bei gesunden Drüsen. Der Großteil der Drüsen weist eine geringere Immunglobulin A-Ausscheidung auf, ein geringerer Teil eine höhere als normale Drüsen. Keine Unterschiede zeigten sich zwischen Pilocarpin- und Ascorbinsäurereiz.

Wie bei der Lysozymausscheidung war auch bei der IgA-Ausscheidung die raschere Ermüdbarkeit der Adenomdrüsen auffallend. Die Ruhesekretionswerte und Werte darunter wurden schneller als von gesunden Drüsen erreicht. (Abb. 8)

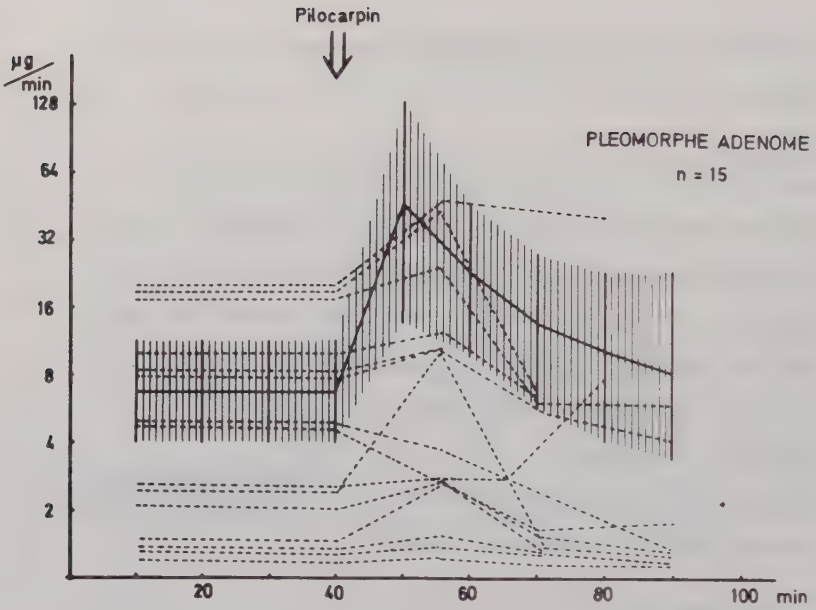


Abb.7. Gesamtlysozymausscheidung der pleomorphen Adenome in Ruhe und nach Pilocarpinreiz. Die Ruhe- und Stimulationssekretion liegen deutlich unter der Norm. Die Sekretionsmaxima werden verspätet erreicht.

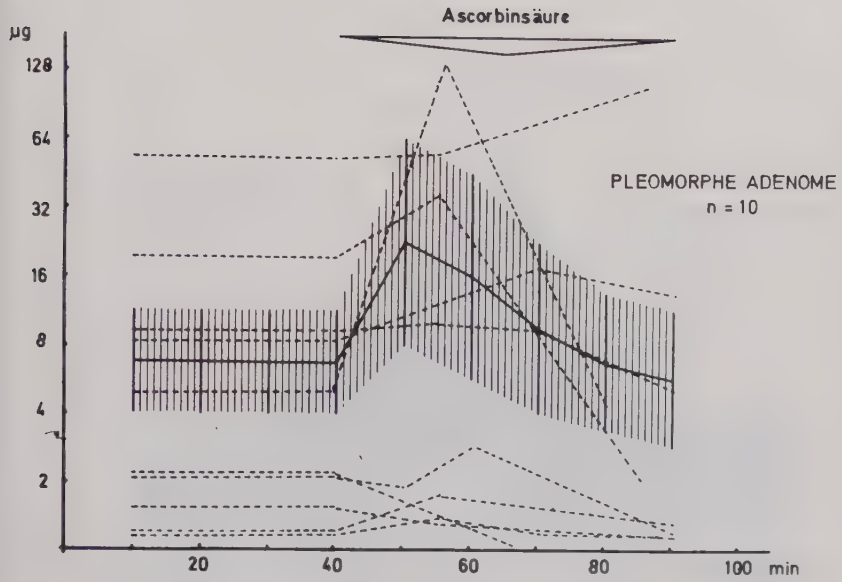


Abb.7a. Gesamtlysozymausscheidung der pleomorphen Adenome
in Ruhe und nach Ascorbinsäurereiz. Die Ruhe und die Reizse-
kretion liegen deutlich unter der Norm.

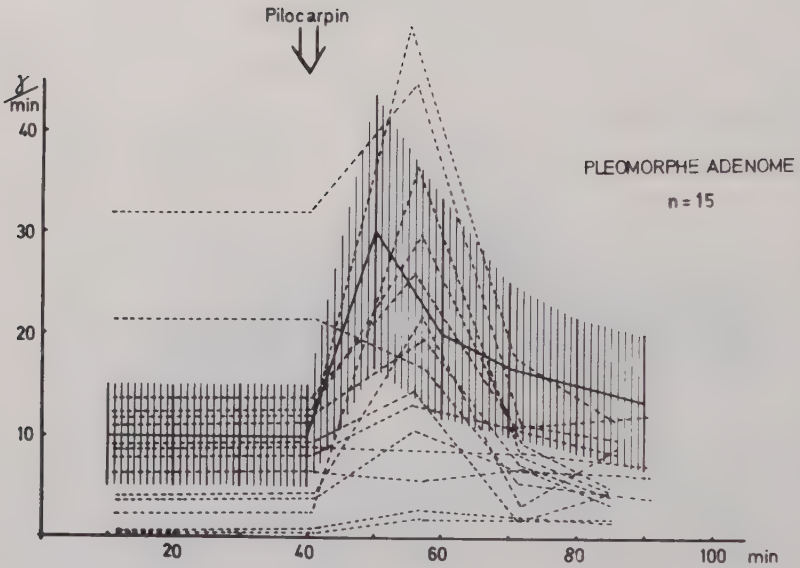


Abb.8. Gesamtimmunglobulin A-Ausscheidung in Ruhe und nach Pilocarpinreiz bei pleomorphen Adenomen.

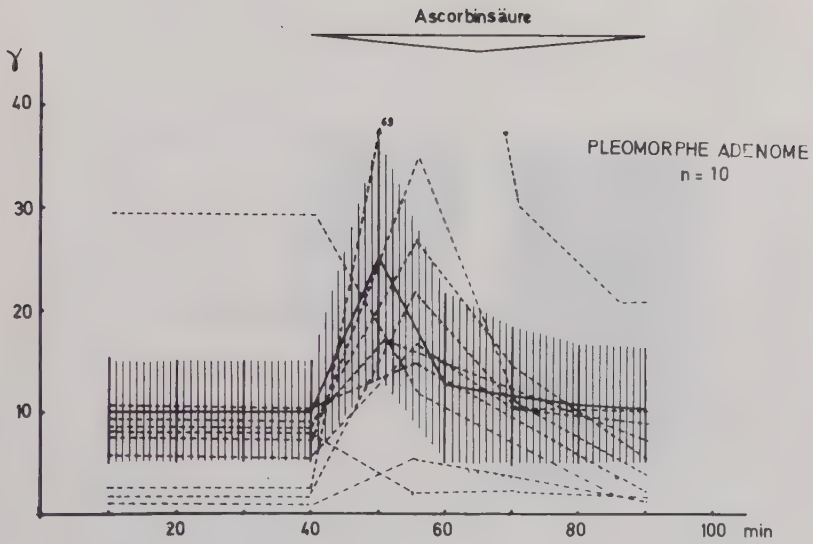


Abb. 8a. Gesamtimmunglobulin-A-Ausscheidung in Ruhe und nach Ascorbinsäurereiz bei pleomorphen Adenomen.

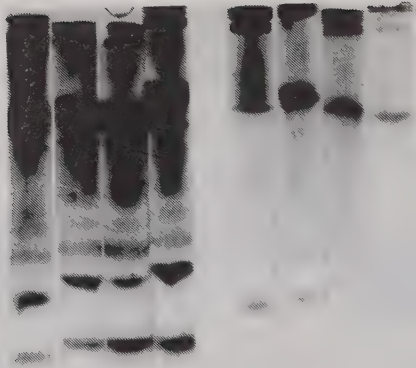


Abb.6 Diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes einer an einem pleomorphen Adenom erkrankten Glandula parotis. Links gesunde, rechts kranke Seite bei simultaner Abnahme.

IgA-Lysozym-Korrelation:

Im Vergleich zu den Voruntersuchungen an Normalpersonen konnte bei den Sekreten von Ohrspeicheldrüsen mit pleomorphen Adenomen kein reziprokes Verhalten von Immunglobulin A- und Lysozymsekretion festgestellt werden. In der Regel wurde bei verminderter IgA-Sekretion auch eine deutlich verringerte Lysozymausscheidungsrate gefunden. Lediglich bei zwei Patienten ergab sich bei normaler Immunglobulin A-Sekretion eine stark erhöhte Lysozymausscheidung. Diese beiden Fälle jedoch lassen keine Aussage zu über eine strenge Beziehung der Ausscheidung dieser beiden Abwehrstoffe beim pleomorphen Adenom.

Zusammenfassung:

Beim pleomorphen Adenom wurden folgende signifikanten Veränderungen im Sekretionsverhalten gefunden:

1. Verspätete und verstärkte Reaktionen nach Pilocarpinreiz
2. Erniedrigte Gesamtproteinausscheidung unter Reiz
3. Starke Schwankungsbreiten der IgA- und Lysozymsekretion
4. Schnellere Erschöpfung der Drüsensekretion unter Reizbedingungen.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die gefundenen p-Werte der Untersuchungsergebnisse im Vergleich zum Normalkollektiv. Die Auswertung er-

folgte statistisch nach dem Students-T-Test.

Pleomorphe Adenome

	Ruhe	10 min nach Reiz	50 min nach Reiz
Ges.Eiweiß			
Ascorb.reiz	0,80	0,001	0,05
Ges.Eiweiß			
Piloc.Reiz	0,80	0,001	0,005
Ges.IqA			
Ascorb.Reiz	0,20	0,25	0,001
Ges.IqA			
Piloc.Reiz	0,40	0,1	0,001
Ges.Lysozym			
Ascorb.Reiz	0,80	0,001	0,025
Ges.Lysozym			
Piloc.Reiz	0,80	0,10	0,001

3.Cystadenolymphome:

Nach den Pleomorphen Adenomen sind die Cystadenolymphome die zweithäufigste gutartige Tumorart der Ohrspeicheldrüsen.

Nach der erstmaligen Beschreibung der Cystadenolymphome durch ALBRECHT und ARZT als selbstständige Tumoren, bekamen sie 20 Jahre später von WARTHIN den seither im angelsächsischen Sprachraum gebräuchlichen Namen WARTHIN-Tumor.

Mit einer deutlichen Geschlechtsprävalenz erkranken Männer fünf mal häufiger als Frauen. Das Haupterkrankungsalter liegt im 5. und 6. Lebensjahrzehnt.

Flußraten:

Da sich bei den Untersuchungen der pleomorphen Adenome kein Unterschied zwischen Ascorbinsäurereiz und Pilocarpinreiz zeigte, wurde bei den Cystadenolymphomen nur die Veränderung unter Pilocarpinreiz betrachtet.

Unter Pilocarpinstimulation verhalten sich die Flußraten ähnlich dem Normalkollektiv. Die Ruhesekretionswerte liegen im unteren Normbereich. Die Flußratenmaxima werden wie bei den pleomorphen Adenomen wesentlich später erreicht. Die Sekretion kehrt innerhalb des Untersuchungszeitraumes nicht mehr auf die Ausgangswerte zurück. (Abb.9)

Gesamtproteinausscheidung:

Die Ruhesekretion an Gesamteiweiß liegt unter 0,2 mg/ml, also deutlich unter der Norm. Unter Pilocarpinreiz wird dieses Verhalten noch deutlicher. Vier, der fünf an Cystadenolymphomen erkrankten Drüsen erreichen innerhalb des Untersuchungszeitraumes annähernd wieder die Ruhesekretionswerte. (Abb.10)

Diskelektrophoretische Untersuchungen:

Wie bei den pleomorphen Adenomen zeigt sich hier die beschriebene Gesamtproteinverminderung in einem Hellerwerden der Banden gegenüber dem Normalkollektiv. Im kathodennahen Gelbereich sieht man keine wesentlichen

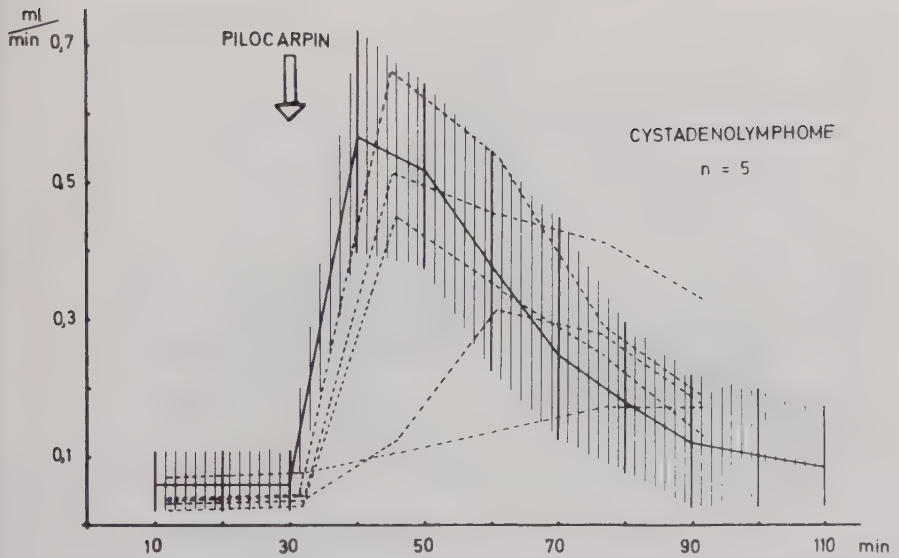


Abb.9. Flußraten der Cystadenolymphome. Ruhesekretion im unteren Normbereich. Sekretionsspitzen später erreicht.

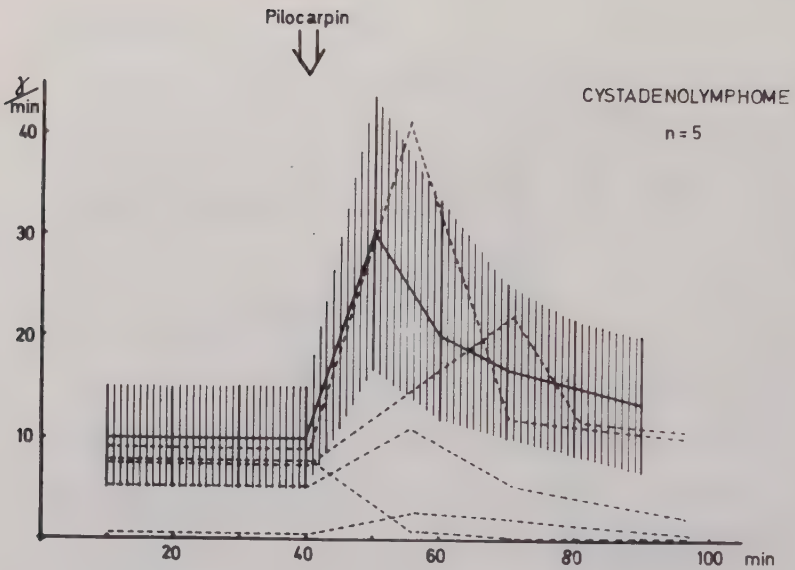


Abb.10. Gesamtproteinausscheidung der Cystadenolymphome in Ruhe und nach Pilocarpinreiz. Die Ruhe- und Reizsekretion unterschreitet deutlich die Norm.

Veränderungen, d.h. die Banden a bis e unterscheiden sich kaum von denen des Normalkollektivs. In den anodennahen Bereichen jedoch findet sich bei allen Sekreten eine unruhigere Bandenstrukturierung, die durch eine Zwischenbande zwischen h und j hervorgerufen wird; diese Bande wird mit h1 bezeichnet. Im Reizspeichel erscheinen die ohnehin schwachen Banden a, b, c im kathodennahen Bereich noch deutlich schwächer. Im Anodenbereich wird die h-Bande zugunsten der f-Bande schwächer, die i, j-Banden bleiben konstant farbintensiv. (Abb. 10a)

Lysozymausscheidung:

Die Betrachtung der Gesamtysozymausscheidung ergibt die klarsten Unterschiede zu gesunden Drüsen. Sowohl Ruhesekretionswerte als auch Ausscheidungsmaxima liegen deutlich unter der Norm. Nach Stimulation werden die Ruhesekretionswerte nicht mehr erreicht. (Abb. 11)

Immunglobulin A-Ausscheidung:

Die IgA-Ausscheidung läßt keine eindeutige Aussage zu. Die Ruhesekretionswerte liegen zum großen Teil im Normbereich, während die Sekretionsmaxima etwa zur Hälfte in, zur Hälfte unter der Norm liegen. Bei einer Drüse zeigte sich nach Stimulation gar ein Abfall der IgA-Ausscheidung. (Abb. 12)

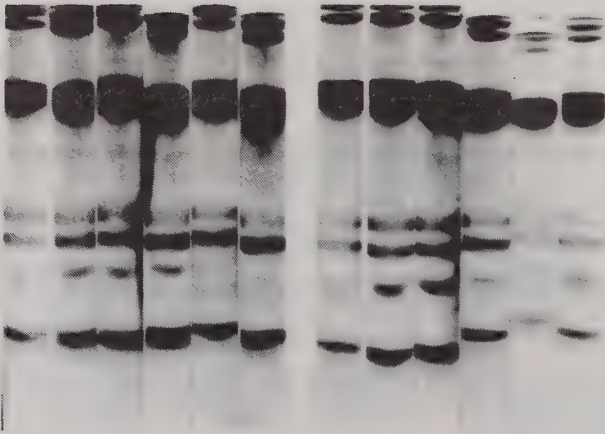


Abb.10a Diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes einer an einem Cystadenolymphom erkrankten Glandula Parotis.

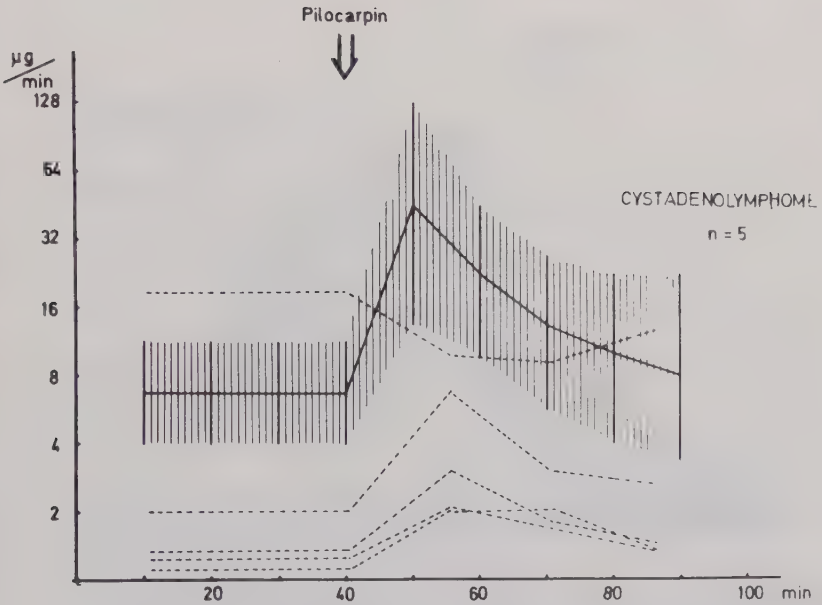


Abb.11. Gesamtlysozymausscheidung der Cystadenolymphome in Ruhe und nach Pilocarpinreiz. Die Ruhe- und Reizsekretionswerte liegen deutlich unter der Norm. Nach Stimulation werden die Ruhesekretionswerte nicht mehr erreicht.

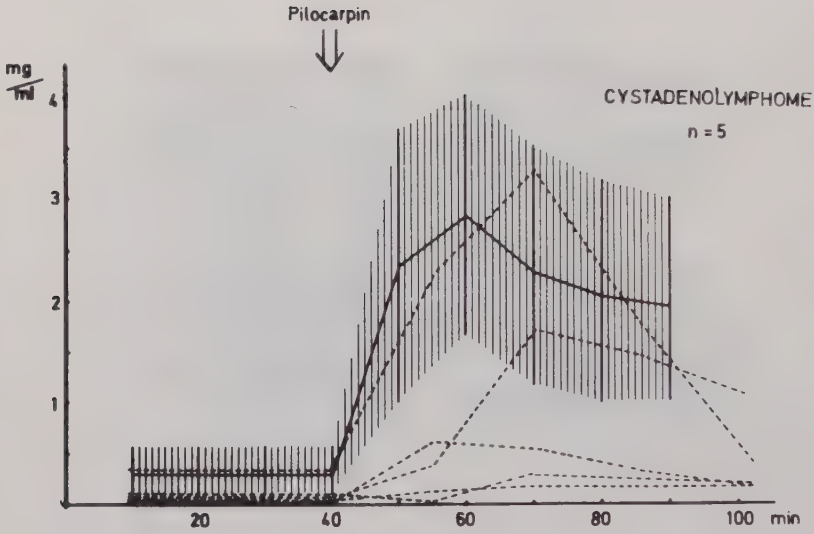


Abb. 12. Gesamtimmunglobulinausscheidung der Cystadenolymphome in Ruhe und nach Pilocarpinreiz.

Lysozym-IgA-Korrelation:

Es kann keine strenge Beziehung zwischen IgA-und Lysozymausscheidung gefunden werden. Bei der Mehrzahl der untersuchten Drüsen verhalten sich die Parameter parallel, d.h. bei verminderter IgA-Ausscheidung findet sich auch eine verminderte Lysozymsekretion. Auffallend ist lediglich, daß Lysozym empfindlicher reagiert, als IgA, d.h. bei noch normaler IgA-Ausscheidung, zeigt sich bereits eine verminderte Drüsensekretionskapazität an Lysozym. Ist bei den einzelnen an Cystadenolymphomen erkrankten Drüsen auch die IgA-Ausscheidung bereits unter der Norm, so ist die Lysozymausscheidung noch deutlicher verringert.

Statistische Auswertung nach dem Students-T-Test:

(p-Werte)

	Ruhe	10min.nach Reiz	50min.nach Reiz
Protein	0,025	0,005	0,001
IgA	0,001	0,001	0,001
Lysozym	0,05	0,25	0,01

4. Malignome:

Bösartige Tumoren der Ohrspeicheldrüsen können in primär epitheliale, mesenchymale, neurogene und dysontogenetische und sekundäre in Form von Metastasen oder invasiv wachsenden Malignomen der Umgebung eingeteilt werden.

Die zwölf untersuchten Malignome setzten sich aus zwei Adenoid-zystischen Karzinomen, acht Plattenepithelkarzinomen und einer Melanommetastase zusammen.

Flußraten:

Die Ruhesekretionswerte der Malignomdrüsen liegen unter denen des Normalkollektivs, bzw. im unteren Normbereich. Der Anstieg zu den Sekretionsmaxima dauert bei Malignomdrüsen ebenso lang wie bei gesunden Drüsen. Die Sekretionsspitzen liegen deutlich niedriger. (Abb. 13)

Gesamtprotein:

Die Gesamtausscheidungswerte in Ruhe lagen ebenso, wie die Sekretionsspitzen deutlich unter der Norm. Die Sekretionsmaxima waren zeitlich nicht verschoben. Die Konzentration an Protein war höher als beim Normalkollektiv. Der erwähnte Unterschied in der Gesamtausscheidung beruht auf den extrem erniedrigten Flußraten. (Abb. 14)

Diskelektrophorese:

Die Banden a, b, c gewinnen gegenüber dem Normalspeichel stark an Farbintensität. Auch die Zwischenzone c1 wird stärker angefärbt. Die Gruppe der Amylasebanden d1 bis d4 bleibt gleich stark. In der Zwischenzone von d bis e1 treten zwei bis drei Banden deutlich hervor. Die starke Verbreiterung der h-Bande, die dem Albumin entspricht,

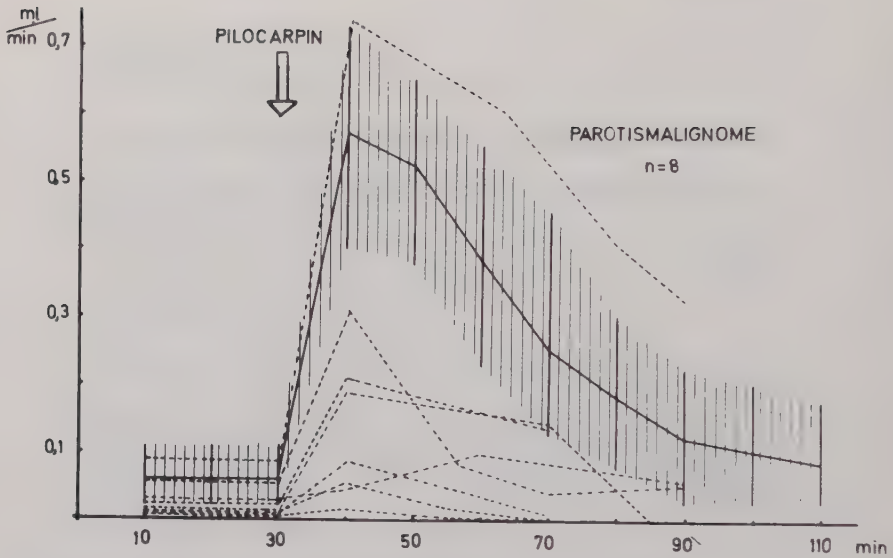


Abb.13. Flußraten der Parotismalignome. Es liegt eine deutliche Erniedrigung, sowohl der Ruhe, als auch der Reizsekretion.

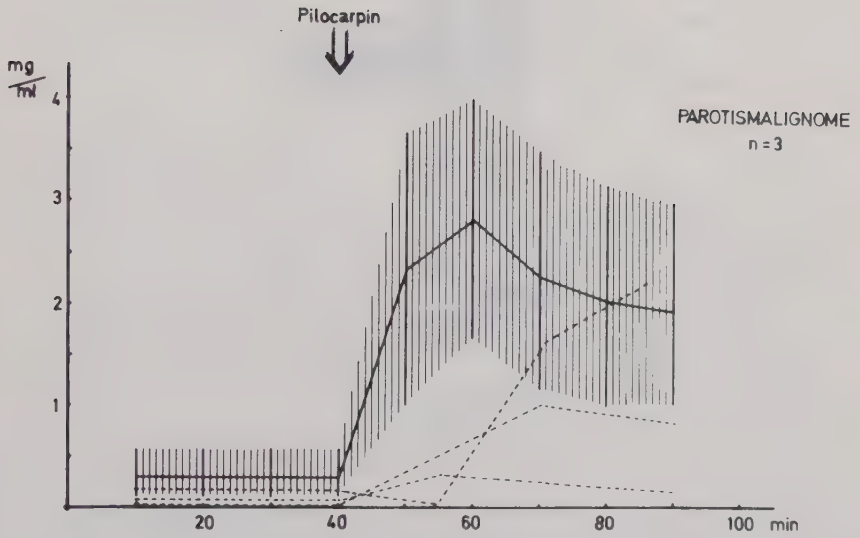


Abb. 14. Gesamtproteinausscheidung der Malignome. Die Ruhesekretion liegt im unteren Normbereich, die Stimulationsekretion deutlich unter der Norm.

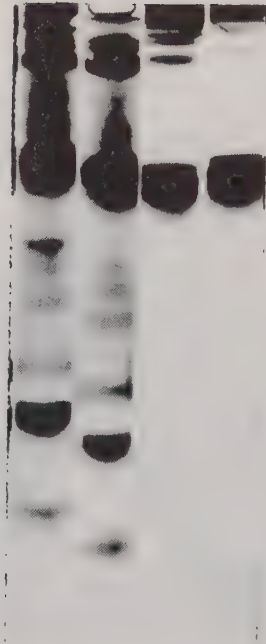


Abb.14a Diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes einer an einem Malignom erkrankten Glandula parotis. Rechts die kranke Seite, links die gesunde Seite bei Simultanabnahme.

ist am charakteristischsten. Die i, j-Banden bleiben unverändert. Das Reizsekret unterscheidet sich in der Bandenstruktur nicht wesentlich vom Ruhesekret, was durch die geringe Zunahme der Flußrate bedingt ist.

Abb. 14a

Lysozym:

Die Ruhesekretionswerte an Gesamtlysozym liegen weit unter der Norm, fast nie höher als 1 µg/min. Auch die Sekretionsmaxima liegen bis auf eine Ausnahme, die Melanommetastase, tiefer als beim Normalkollektiv. Die Sekretionsspitzen liegen bei der Mehrzahl der Patienten ca. 1/2 Stunde später. (Abb. 15)

Immunglobulin A:

Auch die Gesamtausscheidung an IgA ist erniedrigt. Die Ruhesekretionswerte liegen im unteren Bereich des Normalkollektivs, die Reizwerte deutlich unter dem Normbereich. Heraus fällt lediglich wieder der eine Patient mit der Melanommetastase. Die Sekretionsmaxima liegen nur wenige über den Ruhewerten. (Abb. 16)

IgA-Lysozym-Korrelation:

Bei annähernd normaler IgA-Sekretion fand sich bereits eine reduzierte Lysozymausscheidungsrate. Auch bei den Malignomen reagiert also die Lysozymausscheidung empfindlicher auf Parenchymschädigung, als die IgA-Produktion.

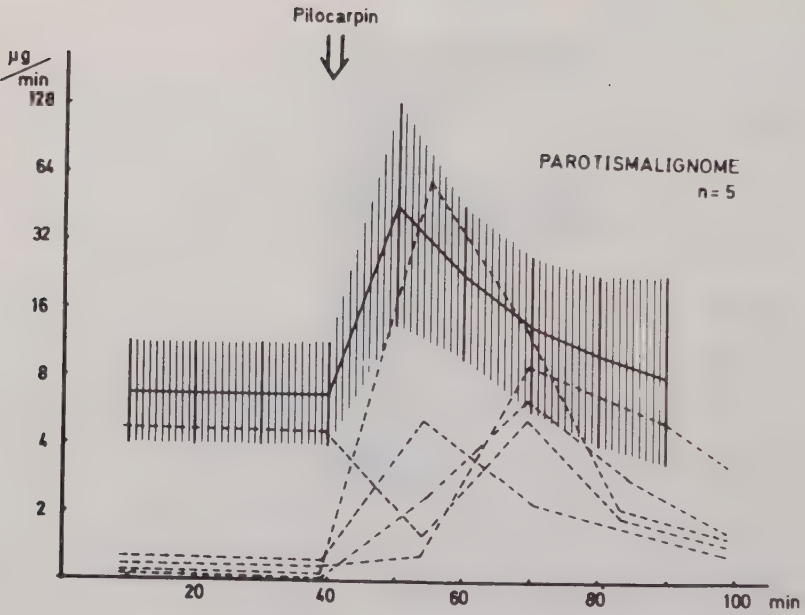


Abb.15. Gesamtlysozymausscheidung der Parotismalignome. Die Ruhe- und die Reizsekretionswerte liegen weit unter denen der gesunden Drüsen. Die Sekretionsspitzen liegen verspätet.

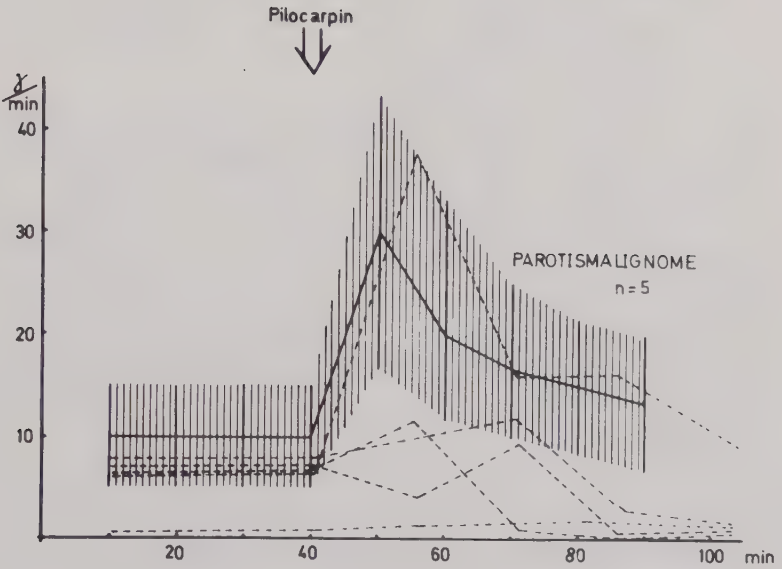


Abb.16. Gesamt-Immunglobulinausscheidung der Malignomdrüsen.
Die Ruhesekretionswerte liegen im unteren Normbereich, die
Stimulationswerte deutlich unter der Norm.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Signifikanzberechnungen bei Drüsen mit Malignomen in Ruhe und nach Pilocarpinreiz.

	Ruhe	10 min.-	50 min.nach Reiz
Ges.Protein	0,05	0,005	0,001
Ges.IgA	0,001	0,001	0,001
Ges.Lysozym	0,10	0,25	0,005

5. Zusammenfassende Tabelle aller Sekretbefunde:

	Pleomorphe Adenome	Cystadenolymphome	Malignome
Flußrate	n - ↑	n - ↓	↓ ↓
Proteinkonzentration	↓	↓	n - ↑
Proteingesamtausscheidg.	n - ↓	↓	↓
IgA-Konzentration	n	↓	↑
IgA-Gesamtausscheidung	n	n - ↓	n - ↓
Lysozymkonzentration	n - ↓	↓	n
Lysozymgesamtausscheidg.	n - ↓	↓	↓

E. Diskussion:

Nach mechanischer, gustatorischer, oder parasymphatischer Reizung stammen 35 bis 60 % des Speichels von der Glandula Parotis. Wird also die Gesamtspeichelzusammensetzung durch Erkrankung dieser Drüse verändert, kann dadurch ein wesentlicher Einfluß auf die Abwehrlage der Mundhöhle genommen werden. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen über biochemische Veränderungen, insbesondere die Eiweißzusammensetzung, bei bestimmten Erkrankungen der Speicheldrüsen. Nur vereinzelt sind in der Literatur Elektrolytbestimmungen bei Ohrspeicheldrüsenentzündungen angeführt.

Es sollte versucht werden mit biochemischen Kriterien die tumorösen Veränderungen der Ohrspeicheldrüsen zu differenzieren, insbesondere gut- und bösartige Geschwülste zu trennen.

Die Pleomorphen Adenome zeigen nach Pilocarpinreiz eine deutliche zeitliche Verschiebung des Flußratenmaximums, wobei die Spitzenflußraten annähernd gleich hoch bleiben. Der Reiz wird von Drüsen mit dieser Tumorart empfindlicher und anhaltender beantwortet, als von Normaldrüsen. Zudem erweist sich die Gesamtproteinausscheidung als deutlich verringert. Nach Stimulation wird die Ausscheidungsrate signifikant niedriger im Vergleich zum Normalkollektiv. Nach SEIFERT könnte man diese verminderte Proteinsekretionsleistung als Proteodyschilie deuten. VOGT und ZAHL

finden bei Diabetikern ähnliche Befunde. Auch sie beschrieben erniedrigte Eiweißkonzentrationen bei gleichzeitiger Erniedrigung der Flußrate.

Über Immunglobulin-A-Veränderungen bei Pleomorphen Adenomen ist in der Literatur bisher nichts beschrieben. Nach den vorliegenden Befunden kann man in Bezug auf die Immunglobulin-A- Ausscheidung eine pathognomische Veränderung nicht feststellen. Es ist lediglich zu bemerken, daß die Schwankungsbreite der sezernierten IgA-Menge wesentlich größer war, als beim Normalkollektiv.

Die Veränderungen in Bezug auf das Lysozymsekretionsverhalten waren ähnlich uncharakteristisch. Der Großteil der untersuchten Drüsensekrete der pleomorphen Adenome zeigte jedoch eine erniedrigte Lysozymausscheidungsfähigkeit.

Hinsichtlich der Flußraten und Gesamtproteinausscheidung boten die Drüsen mit Cystadenolymphomen ein ähnliches Bild, wie die an Mischtumoren erkrankten Drüsen. Allerdings wurden die Flußratenausgangswerte während des Untersuchungszeitraumes nicht mehr erreicht. Unterschiede zeigten sich hingegen hinsichtlich der IgA- und Lysozymsekretion. Bei annähernd normaler IgA-Ausscheidung, fand sich eine deutlich verringerte Lysozymsekretion.

Charakteristische Veränderungen im Vergleich zu den mit Pleomorphen Adenomen und Cystadenolymphomen befallenen Drüsen, zeigten die Drüsen mit Malignomen.

Auffallend waren die Unterschiede bei der Betrachtung der Flußraten, der Gesamtproteinausscheidung und des Lysozym- und IgA-Sekretionsverhaltens. Die Flußraten waren im Ruhe und Reizzustand stark reduziert. Die Immunglobulin A und die Gesamteiweißausscheidung war annähernd normal, die Lysozymsekretion gegenüber dem Normalkollektiv deutlich verringert. Ein signifikanter Parameter zur Differentialdiagnose gegen die gutartigen Ohrspeicheldrüsentumoren bietet sich in der wesentlich erhöhten Eiweißkonzentration der Sekrete an.

Die diskelektrophoretischen Auftrennungen zeigten zwei wesentliche Veränderungen im Vergleich zu Normalelektrophoresen. Die pleomorphen Adenome boten eine deutliche Gesamtproteinverminderung, die sich in einem Hellerwerden der Banden im Vergleich zu Normalbefunden äußert. In dieser Beziehung sind die Cystadenolymphomdrüsen nicht von denen mit Mischtumoren zu unterscheiden. Als zweite bemerkenswerte Veränderung fanden sich bei Patienten mit malignen Ohrspeicheldrüsentumoren durch Serumproteine verursachte Bandenvermehrungen, bzw. Verstärkungen.

Da die Amylase den Hauptanteil der von den Drüsencini sezernierten Proteine ausmacht, erlauben die Amylasebanden einen Einblick in die Kapazität des Parenchyms. Für die durch die Entzündung bedingte Permea-

bilität des Ausführungsgangepithels kann andererseits die Ausscheidung an Albumin herangezogen werden. Eine erhöhte Transsudation von Albumin kann als ein Parameter für den Schädigungsgrad des Ausführunggangsystems gelten.

In Serumvergleichsläufen wurde übereinstimmend mit OPPENHEIM und Mitarbeitern die von ihm als Albumin vermutete Bande an gleicher Stelle der Elektrophorese gefunden.

Zusammenfassung

Nach fraktionierter Abnahme wurden Ruhe und Reizsekret von Ohrspeicheldrüsen mit Tumoren hinsichtlich der Parameter Flußrate, Gesamteiweißausscheidung, elektrophoretischer Auftrennung, sowie Immunglobulin A und Lysozymgehalt untersucht und mit den Befunden bei normalen Drüsen verglichen.

Dabei zeigte es sich, daß durch die sialochemische Untersuchung eine Unterscheidung der einzelnen Krankheitsbilder der Speicheldrüsentumoren: pleomorpher Adenome, Cystadenolymphome und Malignome möglich ist. Flußrate, Protein- und Immunglobulin-A-Konzentration sind dabei als wichtigste Parameter hervorzuheben.

Die Flußrate ist bei den gutartigen Tumoren annähernd normal, während sie bei allen bösartigen Tumoren stark vermindert gefunden wurde. Auch die Parameter Immunglobulin-A und Lysozym zeigen, vor allem unter Berücksichtigung der Konzentration, ein deutlich unterschiedliches Verhalten der gut- und bösartigen Tumoren: Während bei den pleomorphen Adenomen und den Cystadenolymphomen die Konzentrationen normal bis erniedrigt sind, sind sie bei den bösartigen Tumoren stark erhöht. Das gleiche gilt für die Gesamteiweißausscheidung.

Es scheint somit die sialochemische Differenzierung zwischen gut- und bösartigen Tumoren möglich.

Literaturverzeichnis

1. Adinolfi, M., A.A. Glynn, Mc Lindsac, G.M. Millue:
Serological properties of -A-Antibodies to
Escherichia Coli present in human colostrum.
Immunology 10 (1966) 517
2. Albecker, K.W., O. Müller: Der Tagesrhythmus der Se-
kretionszyklus der Glandula submandibularis der
Ratte. Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.-u. Kehlk.-Heilk.
204 (1973) 27
3. Albrecht H., L. Arzt: Beiträge zur Frage der Gewebs-
verirrung. Papilläre Cystadenome in Lymphdrüsen.
Path. 4 (1910) 47
4. Alderton G., W.H. Ward and H.L. Fevold: Isolation of
Lysozym of egg white. J. biol. chem. 157 (1955) 43-58
5. Armstrong W.G.: Charakterisation studies on the spe-
cific human salivary proteins absorbed in vitro by
hydroxyapatite. Caries Res. 5 (1971) 215
6. Azzopardi I.G., L.T. Hou: The genesis of Adenolymphoma.
I. Path. Bact. 88 (1964) 213
7. Balekjian, A.V., R.W. Longton, H.D. Tow: Isolation of a
protamine from human parotid fluid. Intern. Ass. for
Dent. Res. Preprinted Abstracts, 50 th General Meeting,
Abstract 946 (1972)
8. Bhoola, K.D., M.W. McNicol, S. Oliver, I. Foran: Changes in
salivary enzymes in patients with sarcoidosis. New Engl.
J. Med. 281 (1969) 877

- 9.Brands,Th.: Diagnose und Klinik der Erkrankungen der großen Kopfspeicheldrüsen.Urban und Schwarzenberg, München 1972
- 10.Brabdtzaeg,P.: Human sekretory Immunglobulins.VII. concentrations of parotid IgA and other sekretory proteins in relation to the rate of flow and duration of sekretory stimulus.Archs oral.Biol.16 (1971) 1295
- 11.Burgen,A.S.V.,P.Seeman: The role of the salivary duct system in the formation of the saliva.Can.J.Biochem.Phvsiol.(1958) 36,19-142
- 12.Caldwell,R.C.,W.Pigman: Disk-Elektrophoresis of human saliva in polyacrylamid-gel.Arch.Biochem.Bioophys. 110 (1965) 91
- 13.Chauncey,H.H. und a.: Enzymes of human saliva.J.D. Res.33 (1954) 321
- 14.Chodirker,W.B.,Tomasz T.B.:Gamma-globulins:quantitative relationship in human serum and non vascular fluids.Science 142 (1963) 1080
- 15.Cruickshank,A.H.,:J.clin.Path.18,391 (1965)
- 16.Dawes,C.,B.Y.Ong: Circadian rhytmus in the concentrations of protein and the main electrolytes in human unstimulated parotid saliva.Arch.oral.Biol.18 (1973) 1233
- 18.Eneroth,C.M.:Die Malignität der Mischtumoren.H.N.O. (Berl.) 16 (1968) 131

19. Evans, R.W., A.H. Cruickshank: Epithelial tumors of the salivary glands. London W.B. Saunders (1970)
20. Ferguson, D.B. u. a.: Circadian rhythm in human parotid flowrate and composition. Arch. oral. Biol. 18 (1973) 1155
21. Fleming, A., V.D. Allison: On the development of strains of bacteria resistant to lysozym action and the relation of lysozym action to intracellular digestion. Brit. J. exp. Path. 8 (1927) 214
22. Fleming, A., V.D. Allison: Observation on the bacteriologic substance ("lysozym") found in secretions and tissues. Brit. J. exp. Path. 12 (1922) 252
23. Foote, F.W., E.L. Frazell: Tumors of major salivary glands. Cancer 6 (1953) 1065
24. Gabl, F.: Elektrophoretische und immunologische Untersuchungen spezieller Speichereiweißkörper. Protides Biol. Fluids Proc. Coll. 10 (1962) 230
25. Haworth, J.C., L. Dilling: Concentration of -A-Globulin in serum, saliva and nasopharyngeal secretions of infants and children. J. Lab. Clin. Med. 67 (1966) 922
26. Hurlimann, J., H. Darling: Synthesis of Immunglobulin-A by salivary gland from animals of different species. Immunology 20 (1971)
27. Jolles, P.: in: The Enzymes (Ed.: P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck) Academic Press, New York, Inc. 4 (1960) 431
28. Kauffmann, D.L., N.J. Zager, E. Cohen, P.J. Keller: The isoenzymes of human parotid saliva. Archs. Biochem. Biophys. 137 (1970) 325

29. Kleinsasser, O.: Einteilung, Morphologie und Verhalten der epithelialen Speicheldrüsentumoren. H.N.O. (Ber.) 17 (1969)
30. Mandel, I. D. and H. S. Khurana: The relation of human salivary Gamma-A-globulin and albumin to flow rate. Archs. oral. Biol. Vol 14 (1969) 1433
31. Masson, P. L., A. O. Carbonara, J. F. Heremans: Studies on the proteins of human saliva. Biochem. Biophys. Acta 107 (1965) 485
32. Maurer, C.: Schnellbestimmung von Gesamtprotein im Liquor cerebrospinalis ohne Fällung mit einer modifizierten Biuretmethode. Z. chlin. chem. biochem. 6 (1968) 217
33. Maurer, H. R.: Diskelektrophorese, De Gruyter, Berlin (1968)
34. Mayo, J. W., D. M. Carlson: Protein composition of human submandibular secretions. Arch. Biochem. Biophys. 161 (1974) 134
35. McFarland, J.: Histopathologic prognosis of salivary gland mixed gland tumors. Amer. J. med. sci., 203, 205
36. McFarland, J.: The myserious mixed tumors of the salivary glands. Surg. Gynec. Obst. (1943) 76, 23
37. Meyer, P., K. Vogt, R. Zippel: Zur Bestimmung von Gesamteiweiß im Speichel. Z. Laryng., Rhinol. 46 (1967) 905
38. Oppenheim, F. G.: Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. Helv. odont. Acta 14 (1970) 10

39. Pierce, A.E.: Specific antibodies at mucous surfaces. *Vet. Rev. Anat.* 3 (1959) 17
40. Rauch, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen. Thieme Stuttgart 1955
41. Salton, M.R.J.: The properties of lysozym and its action on microorganisms. *Bact. Rev.* 21 (1927) 82
42. Seifert, G.: Die Mundspeicheldrüsen aus Doer Uehlinger. *Spezielle path. Anatomie Bd. I* Springer Verlag (1966) 161
43. Seifert, G.: Die pathologische Anatomie der Speicheldrüsenerkrankungen, *HNO-Wegw. Bd. 13* (1965) 1
44. Sellner, J.C., D.A. Merrill, H.N. Claman: Salivary immunoglobulins: absence of -A in saliva following exchange transfusion in neonatal period. *Pediatrics* 40 (1967) 452
45. Skurk, A., G. Miynski, K. Fendel: Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung im menschlichen Parotisspeichel. *Acta otorhinolaryng.* 71 (1971) 71
46. South, M.A.: On IgA. *Gastroenterology* 56 (1969) 639
47. Stiehm, E.R., J.P. Vaerman, H.H. Fudenberg: Plasmainsfusions in immunologic deficiency states: metabolic and therapeutic studies. *Blood* 28 (1966) 918
48. Tomasi, T.B., J. Bienenstock: Secretory immunoglobulins. *Advanc. Immunol.* 9. (1968) 1
49. Ungerecht, K.: Diagnostik und Therapie der Parotiserkrankungen, *MMW* 116 nr. 9 (1974) 439
50. Vogt, K., J. Zahl: Über Einflüsse von Diabetes mellitus und Geschlecht auf die Sekretion der Glandula parotis.

- des Menschen. Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.-u. Kehl.-Heilkunde 203 (1973) 310
51. Vogt, K., W. M. Seemann: Zur physiologischen Beeinflussung der Gesamtpreoteinsekretion der großen Kopfspeicheldrüsen durch Tageszeit, Alter und Geschlecht. Z. Laryng. Rhinol. 49 (1970) 611
52. Warthin, A. S.: Papillary cystadenoma lymphomatosum, a rare teratoid of the parotid region. J. Cancer Res. 13 (1929) 116
53. Wolf, R. O., L. L. Taylor: A comparative study of saliva protein analysis. Arch. Oral. Biol. 9 (1964) 135
54. Wotman, S., L. Greenbaum, I. D. Mandel: Studies of human salivary kallikrein. Biochem. Phar. 18 (1969) 148

Lebenslauf

geboren am 13.1.1949 in Oberkammlach

Eltern: Lothar Baur, Realschuldirektor
Veronika Baur, geb. Kugler

Konfession: römisch-katholisch

Familienstand: ledig

Ausbildungsgang:

1955 - 1960 Volksschule Bobingen

1960 - 1970 Humanistisches Gymnasium bei St. Stephan-Augsburg

1970 - 1977 Medizinstudium an der Ludwigs-Maximilians-Universität München

